

1/7/1

DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI

(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

011312430

WPI Acc No: 97-290334/199727

**Sandwich assay for transferrin sialic acid groups - using  
anti-transferrin antibody and labelled Sambucus nigra lectin, for  
diagnosis of alcoholism**

Patent Assignee: LO A (LOAA-I); LO I (LOII-I)

Inventor: LO A

Number of Countries: 021 Number of Patents: 004

**Patent Family:**

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
DE 19543569	A1	19970528	DE 1043569	A	19951122	G01N-033/53	199727 B
WO 9719355	A1	19970529	WO 96EP5141	A	19961121	G01N-033/68	199727
DE 19543569	C2	19980122	DE 1043569	A	19951122	G01N-033/53	199807
EP 874994	A1	19981104	EP 96939883	A	19961121	G01N-033/68	199848
			WO 96EP5141	A	19961121		

Priority Applications (No Type Date): DE 1043569 A 19951122

Cited Patents: 6.Jnl.Ref; US 4626355; US 5179004

**Patent Details:**

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
DE 19543569	A1		10			
WO 9719355	A1	G	33			
Designated States (National): CA JP US						
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE						
DE 19543569	C2		10			
EP 874994	A1	G		Based on	WO 9719355	
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE						

**Abstract (Basic): DE 19543569 A**

Sandwich assay for determining the terminal sialic acid groups of human transferrin in a liquid sample comprises:

- incubating the sample with an anti-transferrin antibody,
- separating the resulting complex from the sample,
- incubating the complex with labelled Sambucus nigra lectin (SNL) and
- determining the amount of antibody-transferrin-SNL complex formed by way of the label.

USE - The assay is used for the determination of sialic-acid-deficient transferrin as an indication of alcohol abuse or alcohol dependence.

ADVANTAGE - Disclosed advantages include high specificity, high sensitivity (detection limit as low as 5 ng), reproducibility, simplicity and rapidity (3.5-4 hr for 96 determinations/  $\mu$ l plate).

Dwg.0/2

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): G01N-033/53; G01N-033/68

International Patent Class (Additional): C12Q-001/28; G01N-033/58

?



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 195 43 569 A 1**

51 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**G 01 N 33/53**  
C 12 Q 1/28  
// C12Q 1/42, 1/26,  
1/32, 1/34, 1/58

21 Aktenzeichen: 195 43 569.9  
22 Anmeldetag: 22. 11. 95  
43 Offenlegungstag: 28. 5. 97

DE 195 43 569 A 1

71 Anmelder:  
Lô, Atou, 70565 Stuttgart, DE; Lô, Insa, 70565  
Stuttgart, DE

74 Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

72 Erfinder:  
Lô, Atou, 70565 Stuttgart, DE

56 Entgegenhaltungen:  
BEAN, P., PETER, J.B.: Alcoholism, Clinical and  
Experimental Research 17 (1993) 6, S. 1163-1170 in:  
STN-Abstract 94161224 MEDLINE;  
CERVEN, C. u.a.: Upsala Journal of Medical  
Sciences 86 (1981) 1, S. 39-53 in:  
STN-Abstract 82063217 MEDLINE;  
RAFFERTY, B. u.a.: Journal of Endocrinology 145  
(1995) 3, S. 527-533 in: STN-Abstract 95363370  
MEDLINE;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Verwendung des Lectins Sambucus nigra zur Quantifizierung der endständigen Sialinsäurereste des  
Human-Transferrin-Moleküls mittels einer vollimmunoenzymatischen Methode (EIA)

57 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren  
zur Bestimmung endständiger Sialinsäuregruppen von Hu-  
man-Transferrin in wäßriger Lösung nach einem Sandwich-  
Prinzip, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine das  
Transferrin enthaltende Probenflüssigkeit mit einer ausrei-  
chenden Menge eines anti-Transferrin-Antikörpers inkubiert,  
den gebildeten Komplex von der Probenflüssigkeit abtrennt,  
mit Sambucus nigra-Lectin inkubiert, wobei das Sambucus  
nigra-Lectin an eine Markierung gebunden oder damit  
bindefähig ist, und den Komplex aus anti-Transferrin-Anti-  
körper, Human-Transferrin und Sambucus nigra-Lectin über  
die Markierung bestimmt. In einer Ausführungsform ermög-  
licht das erfindungsgemäße Verfahren die Bestimmung von  
Sialinsäure-defizientem Human-Transferrin in Körperflüssig-  
keiten.

DE 195 43 569 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 04. 97 702 022/88

7/23

## Beschreibung

## 1. Einführung

Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Interpretation von durch regelmäßigen und mißbräuchlichen Alkoholkonsum verursachten Veränderungen der chemischen Struktur des Transferrins durch eine direkte Quantifizierung der endständigen Sialinsäure-Reste des Transferrin-Moleküls in menschlichen Körperflüssigkeiten.

Die bisher veröffentlichten wissenschaftlichen Arbeiten haben gezeigt, daß diese Molekülveränderungen in Form von fehlendem oder reduziertem Gehalt an Sialinsäure-Resten des Transferrin-Moleküls auftreten.

Gemäß De Jong et al. (1980) setzt sich die häufigste isoforme Struktur des Tetrasialotransferrins (Fig. 1) wie folgt zusammen:

4 endständige N-Acetyl-Sialinsäure-Reste, 4 Galactose-Reste, 8 N-Acetyl-Glucosamin-Reste und 6 Mannose-Reste in beiden Oligosaccharid-Seitenketten des Transferrinmoleküls.

Die  $\alpha$ -anomerische 2-6-Sialin-Galactose-Bindung ermöglicht besonders mit dem Sambucus nigra-Lectin intermolekulare Wechselwirkungen.

## 2. Hauptgegenstand

Das in zwei Varianten vorgestellte EIA-Verfahren ist durch die Verwendung des spezifischen Sambucus nigra-Lectins gekennzeichnet, welches eine große Affinität zum  $\alpha$ -anomerischen endständigen Sialinsäure-Rest aufweist, welcher in 2-6-Stellung an die Galactose-N-acetyl-glucosamin-Kette gebunden ist.

Die Quantifizierung dieser Sialinsäure-Reste erfolgt in drei Etappen:

1. Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes zwischen dem Transferrin und einem polyklonalen anti-Transferrin-Antikörper, der auf der Platte gebunden ist.
2. Bildung eines zusätzlichen molekularen spezifischen Komplexes zwischen dem Sambucus nigra-Lectin und den Sialinsäure-Resten des Transferrins.
3. Oxidation eines Chromogens (ABTS) in Anwesenheit eines für Peroxidase spezifischen Substrats, dessen Farbintensität proportional zum Gehalt an der im Transferrin-Molekül enthaltenen Sialinsäure ist und bei 405 nm gemessen wird.

## 3. Variante A der vorgestellten Methode

Quantitative Bestimmung der Sialinsäure-Reste humaner Isotransferrine (SDT = sialinsäuredefizientes Transferrin) durch eine immunolektinoenzymatische Reaktion unter Verwendung eines Sambucus nigra-Lectin-Peroxidase Konjugats.

## a) Reaktionsprinzip

In der ersten Phase wird das Transferrin von den restlichen Serumproteinen durch Anlagerung an einen humanen anti-Transferrin-Antikörper, der auf der Platten-Oberfläche fixiert wurde, abgetrennt.

In der zweiten Phase bilden die an den endständigen Oligosaccharid-Ketten des Transferrins gebundenen Sialinsäure-Reste einen stabilen Komplex mit dem Sambucus nigra-Lectin, welches mit Peroxidase markiert wurde.

Anschließend entwickelt sich durch die Einwirkung eines für Peroxidase spezifischen Substrats auf das Chromogen ABTS in Anwesenheit von Peroxidase eine grün-blaue Färbung, deren Intensität proportional zum Gehalt an Sialinsäure-Resten im Test ist.

## b) Erforderliche Reagenzien

— Verdünnungslösung für das Serum:

PBS-Puffer: 0,01 M; pH 7,2—7,4;

— Wasch-Lösung:

PBS-Puffer: 0,01 M; pH 7,2—7,4;

— Peroxidase-Substrat-Lösung (Peridrol):

Peridrol-Citrat-Puffer

— Chromogen-Lösung (ABTS):

Wäßrige konzentrierte Lösung von 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl)-benzthiazolin-6-sulfonsäure

— Stopp-Lösung

Wäßrige 1%ige Natriumdodecylsulfat-Lösung

— Beschichtete Mikrotiterplatte mit anti-Transferrin-Antikörpern

## c) Vorbereitung der Mikrotiterplatten

Die Polystyrol-Mikrotiterplatten sind mit 100  $\mu$ l hochgereinigter polyklonaler anti-Transferrin-Lösung (IgG) beschichtet. Die Fixierung erfolgt bei zweistündiger Inkubation bei 37°C und gleichzeitigem Rütteln der Platte. Die Platten werden 3 mal mit der Waschlösung gewaschen und bei minus 20°C aufbewahrt.

## d) Vorbereitung des Testserums

Die Seren werden 1/10 mit der Verdünnungslösung verdünnt (100 µl + 900 µl).

## e) Vorbereitung der Standards und des Kontrollserums

Die Serum-Standards mit 0,5; 1; 2; 4; 8; 16% SDT und das Kontrollserum mit 2% SDT werden mit 0,5 ml bidestilliertem Wasser rekonstituiert.

## f) Einsatz der Proben, Standards und Kontrollen

Eine Doppelbestimmung pro Test ist empfohlen. Je 100 µl der vorbereiteten Lösungen in die Plattenvertiefungen pipettieren. Für den Leerwert 100 µl der Verdünnungslösung in 4 Plattenvertiefungen pipettieren; 1 Std. bei 37°C bei gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubieren.

Nach drei aufeinanderfolgenden Waschungen (immer bei den Leerwerten beginnen!) wird die feuchte Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig abgeklopft.

## g) Einsatz des Sambucus nigra-Lectin-Peroxidase Konjugats

Die Plattenvertiefungen werden mit 100 µl Konjugat-Lösung beschickt und 1 Std. bei 37°C und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert. Das spezifische Konjugat bildet mit den Sialinsäure-Resten, die parallel zum Transferrin/anti-Transferrin gebunden sind, einen stabilen Komplex. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschungen wie zuvor wird die feuchte Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig abgeklopft.

## h) Einsatz des Substrats und des Chromogens

Ansatz einer Substrat-Chromogen Mischung durch Mischen von 0,458 ml Chromogen-Lösung (ABTS) mit 11 ml Substratlösung.

Die Plattenvertiefungen werden mit 100 µl dieser Mischung beschickt und 1 Std. bei Raumtemperatur und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert. Die Reaktion erfolgt mit einer grün-blauen Färbung des oxidierten Chromogens.

Die kinetische Messung dieser Reaktion erfolgt im 15-, 30- oder 60-Minutentakt; die Reaktion kann durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung gestoppt werden.

## i) Messung

Bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer.

## j) Auswertung

Die Auswertung erfolgt mit einer zu erstellenden Konversionskurve, wobei zwei Möglichkeiten in Frage kommen:

## 1. Logarithmische Standard-Kurve (Fig. 2a)

Die erhaltenen Extinktionsdifferenzen der Standards werden nach folgender Formel dezimal-logarithmisch gegen die dezimal-logarithmischen Standardkonzentrationen aufgetragen:

$$\text{Log. } \Delta E = \text{Log. \% SDT}$$

## 2. Sigmoidale Standard-Kurve (Fig. 2b)

Die erhaltenen Extinktionsdifferenzen der Standards werden nach folgender Formel dezimal-logarithmisch gegen die Standardkonzentrationen aufgetragen:

$$\text{Log. } \Delta E = \frac{(a-d)}{[1 + (\frac{x}{c})^b]} + d \% \text{ SDT}$$

Das Kontrollserum (2% SDT) sollte Extinktionsdifferenzen in folgenden Bereichen ergeben:

0,276 ± 10% nach 15' (0,248—0,304)  
0,426 ± 10% nach 30' (0,383—0,492)  
0,528 ± 10% nach 60' (0,475—0,581)

## 4. Variante B der vorgestellten Methode

Quantitative Bestimmung der Sialinsäure-Reste humaner Isotransferrine (SDT = sialinsäuredefizientes Transferrin) durch eine immunolektinoenzymatische Reaktion unter Verwendung eines Sambucus nigra-Lectin-Biotin Konjugats und eines Streptavidin-Peroxidase Konjugats.

## a) Reaktionsprinzip

In der ersten Phase wird das Transferrin von den Serumproteinen durch Anlagerung an einen humanen anti-Transferrin-Antikörper, der auf der Platten-Oberfläche fixiert wurde, abgetrennt.

In der zweiten Phase bilden die an den endständigen Oligosaccharid-Ketten des Transferrins gebundenen Sialinsäure-Reste einen stabilen Komplex mit dem Sambucus nigra-Lectin, welches mit Biotin konjugiert wurde.

Anschließend entwickelt sich durch die Einwirkung eines für Peroxidase spezifischen Substrats auf das Chromogen ABTS in Anwesenheit von Peroxidase eine grün-blaue Färbung, deren Intensität proportional zum Gehalt an Sialinsäure im Test ist.

## b) Erforderliche Reagenzien

– Verdünnungslösung für das Serum:

PBS-Puffer: 0,01 M; pH 7,2 – 7,4;

– Wasch-Lösung:

PBS-Puffer: 0,01 M; pH 7,2 – 7,4;

– Peroxidase-Substrat-Lösung (Peridrol):

Peridrol-Citrat-Puffer

– Chromogen-Lösung (ABTS):

Wäßrige konzentrierte Lösung von 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl)-benzthiazolin-6-sulfonsäure

– Stopp-Lösung:

Wäßrige 1%ige Natriumdodecylsulfat-Lösung

– Mit anti-Transferrin-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte

– Sambucus nigra-Lectin-Biotin Konjugat:

Das lyophilisierte Konjugat ist mit 11 ml bidestilliertem Wasser zu rekonstituieren.

– Peroxidase-Streptavidin Konjugat:

Das lyophilisierte Konjugat ist mit 11 ml bidestilliertem Wasser zu rekonstituieren.

## c) Vorbereitung der Mikrotiterplatten

Die Polystyrol-Mikrotiterplatten sind mit 100 µl hochgereinigter polyklonaler anti-Transferrin-Lösung (IgG) beschichtet. Die Fixierung erfolgt bei zweistündiger Inkubation bei 37°C und gleichzeitigem Rütteln der Platte. Die Platten werden 3 mal mit der Waschlösung gewaschen und bei minus 20°C aufbewahrt.

## d) Vorbereitung des Testserums

Die Seren werden 1/10 mit der Verdünnungslösung verdünnt (100 µl + 900 µl).

## e) Vorbereitung der Standards und des Kontrollserums

Die Serum-Standards mit 0,5; 1; 2; 4; 8; 16% SDT und das Kontrollserum mit 2% SDT werden mit 0,5 ml bidestilliertem Wasser rekonstituiert.

## f) Einsatz der Proben, Standards und Kontrollen

Eine Doppelbestimmung pro Test ist empfohlen. Je 100 µl der vorbereiteten Lösungen in die Plattenvertiefungen pipettieren. Für den Leerwert 100 µl der Verdünnungslösung in 4 Plattenvertiefungen pipettieren; 1 Std. bei 37°C bei gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubieren.

Nach drei aufeinanderfolgenden Waschungen (immer bei den Leerwerten beginnen!) wird die feuchte Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig abgeklopft.

## g) Einsatz des Sambucus nigra-Lectin-Biotin Konjugats

Die Plattenvertiefungen werden mit 100 µl Konjugat-Lösung beschickt und 1 Std. bei 37°C und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert. Das spezifische Konjugat bildet mit den Sialinsäure-Resten, die parallel zum Transferrin/anti-Transferrin gebunden sind, einen stabilen Komplex. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschungen (immer bei den Leerwerten beginnen!) wird die feuchte Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig abgeklopft.

## h) Einsatz des Streptavidin-Peroxidase Konjugats

Die Plattenvertiefungen werden mit 100 µl Konjugat-Lösung beschickt und 1 Std. bei 37°C und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert. Das Konjugat bildet mit dem Lectin durch die Biotin-Streptavidin Bindungen einen

stabilen Komplex. Nach drei aufeinanderfolgenden Waschungen wie zuvor wird die feuchte Platte auf saugfähigem Papier vorsichtig abgeklopft.

#### i) Einsatz des Substrats und des Chromogens

Ansatz einer Substrat-Chromogen Mischung durch Mischen von 0,458 ml Chromogen-Lösung (ABTS) mit 11 ml Substratlösung.

Die Plattenvertiefungen werden mit 100 µl dieser Mischung beschickt und 1 Std. bei Raumtemperatur und gleichzeitigem Rütteln der Platte inkubiert. Die Reaktion erfolgt mit einer grün-blauen Färbung des oxidierten Chromogens.

Die kinetische Messung dieser Reaktion erfolgt im 15-, 30- oder 60-Minutentakt; die Reaktion kann durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung gestoppt werden.

#### j) Messung

Bei 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer.

#### k) Auswertung

Die Auswertung erfolgt wie in Variante A.

Das Kontrollserum (2% SDT) sollte Extinktionsdifferenzen in folgenden Bereichen ergeben:

0,353 ± 10% nach 15' (0,318—0,388)

0,546 ± 10% nach 30' (0,491—0,601)

0,572 ± 10% nach 60' (0,515—0,629)

### 5. Weitere Gegenstände dieser Erfindung

Weiterer Gegenstand dieser Erfindung ist die Möglichkeit, die Quantifizierung von Sialinsäure-Resten mittels anderer mit Sambucus nigra-Lectin konjugierter Enzyme durchzuführen, wie z. B.:

- Alkalische Phosphatase,
- Dehydrogenasen (wie Glucose-6-Dehydrogenase etc.),
- Hydrolasen (wie Urease etc.),
- Oxidasen.

Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, andere Chromogene zu verwenden, wie z. B.:

- Orthophenyldiamin,
- Tetramethylbenzidin,
- 5-Amino-Salicylsäure etc.

Die Durchführung eines Immunofluoreszenztestes ist bei Verwendung eines Konjugats von Sambucus nigra-Lectin mit IFTC (Fluoreszin-isothiocyanat) ebenfalls möglich.

Die Menge der Sialinsäure-Reste kann zu UV-Bestimmungsmethoden mit Alkohol-Dehydrogenase, Glucose-6-Dehydrogenase etc. und mittels den Coenzymen NAD, NADP etc. erweitert werden, oder mittels Verwendung einer Diaphorase, in Anwesenheit von NADP und dem Chromogen Jodo-Nitrotetrazoliumviolett, um ein farbiges Formazan-Derivat zu bilden.

Die Variante B ermöglicht auch die Herstellung von immunochromographischen Schnelltest-Streifen zur qualitativen und semiquantitativen Bestimmung von SDT in Körperflüssigkeiten.

Die vorgeschlagene Methode kann darüber hinaus zur Bestimmung endständiger Sialinsäure-Reste sämtlicher natürlicher Proteine verwendet werden, die endständige Sialinsäure-Reste in 2-6-Stellung gebunden an β-Galactose und N-Acetyl-glucosamin enthalten.

### 6. Vorteile der neuen Methode

1. Hohe Spezifität, denn das Sambucus nigra-Lectin besitzt als Antikörper eine große Affinität zu den endständigen Sialinsäuren und erkennt insbesondere die α-anomerischen Verbindungen in 2-6-Stellung.
2. Große Sensibilität (von bis zu 5 ng im Test).
3. Sehr gute Reproduzierbarkeit.
4. Sehr hohe Präzision von Tag zu Tag und in der Serie.
5. Im Gegensatz zu den bisherigen Bestimmungsmethoden, die einen großen apparativen Aufwand und erfahrenes Personal erforderten, zeichnet sich dieses voll-immunoenzymatische Verfahren durch seine elegante direkte Bestimmungsmethode aus, die keine aufwendigen physikalisch-chemischen Trennverfahren zur Probenaufbereitung mehr benötigt und damit wesentlich einfacher, leichter verfügbar, sehr schnell durchzuführen und nicht anfällig für Arbeitsfehler in der Probenaufbereitungs-Phase ist.
6. Große Einfachheit des Testes, der problemlos als semi-quantitativer Test eingesetzt werden kann, der ohne Photometer mit bloßem Auge abgelesen werden kann.

7. Sehr kurze Reaktionszeit zwischen 3 1/2 Stunden und 4 Stunden für 96 Bestimmungen pro Mikrotiterplatte.

#### 7. Abgrenzung zu anderen Methoden

Von den bisher publizierten Methoden sind anzuführen:

##### 1. Die "Isoelectric Focusing"-Methode

Elektrophoretische Trennung der Isotransferrine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (PI 6,1-5,1). (Helena Stibler et Stefan Borg, Pharmacol Biochem. Behav. 1980, 13, 47—51).

##### 2. Die chromatografische Methode mittels Ionenaustauscher

(Helena Stibler et al., Clinical and Experimental Research Sept/Oct. 1986, Vol. 10. No. 5, 535—543).

##### 3. Die HPLC-Methode

Sättigung der Transferrine mit einem Eisensalz und anschließender Extraktion auf Kolonne, dann erfolgt eine densitometrische Bestimmung. (Strahler et al., J. of Chromatographie 266, 1983, 281—289).

##### 4. Isokratische HPLC-Methode

Beruhet auf der Trennung der Isotransferrine mittels kationischer Puffer. (Jousta Marius et al., Patent Nr.: . . . .), (HPLC-Verfahren nach Jan Jeppson et al., Clin. Chemistry 39/10; 2115—2120 (1993).

##### 5. Turbidimetrische Methode der Firma AXIS

Basiert ebenfalls auf der Sättigung des Isotransferrins mittels Eisensalz oder einer heterogenen Immunoanalyse mit Trennung auf Kolonne gefolgt von einer turbidimetrischen Messung. (Patent: WO 99119983 A 911226)

##### 6. Die immunoenzymatische EIA-Methode durch eine Konjugation von Pharmacia

Verwendet einen monoklonalen Antikörper nach Sättigung des Isotransferrins mittels Eisensalz und Säulentrennung. (O. Mårtensson et al.).

##### 7. Die RIA-Methode von Pharmacia

Chromatografisch mittels Ionenaustauscher; nach Sättigung des Isotransferrins durch ein Eisensalz und quantitativ bestimmt durch Radio-Immuno-Analyse.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung endständiger Sialinsäuregruppen von Human-Transferrin in wäßriger Lösung nach einem Sandwich-Prinzip, dadurch gekennzeichnet, daß man eine das Transferrin enthaltende Probenflüssigkeit mit einer ausreichenden Menge eines anti-Transferrin-Antikörpers inkubiert, den gebildeten Komplex von der Probenflüssigkeit abtrennt, mit Sambucus nigra-Lectin inkubiert, wobei das Sambucus nigra-Lectin an eine Markierung gebunden oder damit bindefähig ist, und den Komplex aus anti-Transferrin-Antikörper, Human-Transferrin und Sambucus nigra-Lectin über die Markierung bestimmt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der anti-Transferrin-Antikörper an eine Festphase gebunden ist oder mit einer Festphase bindefähig ist, wobei mindestens eine Inkubation oder/und Abtrennung des Komplexes in Gegenwart der Festphase durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Festphase die Wand eines Reaktionsgefäßes ist, ausgewählt aus Probenröhrchen, Mikrotiterplatte und Küvette, oder ein teilchenförmiges Material ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Sambucus nigra-Lectin biotinyliert ist und die Markierung an Streptavidin/Avidin gekoppelt ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine Enzymmarkierung ist und die Bestimmung der Markierung die Bestimmung eines chromogenen, lumineszierenden oder fluoreszierenden Substrats des Enzyms oder einer Substrat-bedingten Lichtabsorptionsänderung umfaßt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym ausgewählt ist aus Peroxidase, Alkohol-Dehydrogenase, Glucose-6-Dehydrogenase oder Diaphorase.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung eine Fluoreszenz- oder Lumineszenzmarkierung ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenflüssigkeit eine Körperflüssigkeit ist.

9. Verfahren zur Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Transferrin in Körperflüssigkeiten, dadurch

gekennzeichnet, daß man

- (a) eine bekannte Standardflüssigkeit, enthaltend Isotransferrine und Sialinsäure-defizientes Transferrin in bekannten Mengen mit anti-Transferrin-Antikörper inkubiert,
- (b) den gebildeten Komplex von der Standardflüssigkeit abtrennt,
- (c) den Komplex mit Sambucus nigra-Lectin inkubiert, wobei das Sambucus nigra-Lectin an eine Markierung gebunden oder damit bindefähig ist,
- (d) den Komplex aus anti-Transferrin-Antikörper, Human-Transferrin, Sambucus nigra-Lectin und Markierung abtrennt,
- (d) den Komplex aus anti-Transferrin-Antikörper, Human-Transferrin, Sambucus nigra-Lectin und Markierung abtrennt,
- (e) die Markierung bestimmt und die Korrelation zwischen Meßgröße und dem Gehalt an Sialinsäure-defizientem Transferrin ermittelt,
- (f) die Schritte (a) bis (e) mit einer Human-Körperflüssigkeit wiederholt und das Verhältnis der Meßgrößen als Maß für den Gehalt von Sialinsäure-defizientem Transferrin in der Körperflüssigkeit bestimmt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte (a) bis (e) mit mindestens einer weiteren bekannten Standardflüssigkeit, die eine unterschiedliche Menge von Isotransferrinen oder/und Sialinsäure-defizientem Transferrin aufweist, wiederholt.

11. Verfahren nach Anspruch 9 und Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte (a) bis (e) mit mindestens vier weiteren bekannten Standardflüssigkeiten enthaltend Sialinsäure-defizientes Transferrin im Bereich zwischen 0,5 und 16% wiederholt.

12. Verfahren nach Anspruch 9 bis Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man die Schritte (a) bis (d) mit einer Humanflüssigkeit mit bekanntem Gehalt an Sialinsäure-defizientem Transferrin durchführt, die Markierung bestimmt und die Korrelation der Meßgröße zu den Meßgrößen der Standardflüssigkeiten als interne Kontrolle bestimmt.

13. Verwendung von Sambucus nigra-Lectin in einem Verfahren zur Bestimmung von Sialinsäure-defizientem Transferrin.

14. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 9 bis 12 zur Diagnose von Alkoholmißbrauch oder Alkoholabhängigkeit.

15. Reagenzienkit zur Bestimmung endständiger Sialinsäuregruppen von Human-Transferrin, umfassend in räumlich getrennter Anordnung:

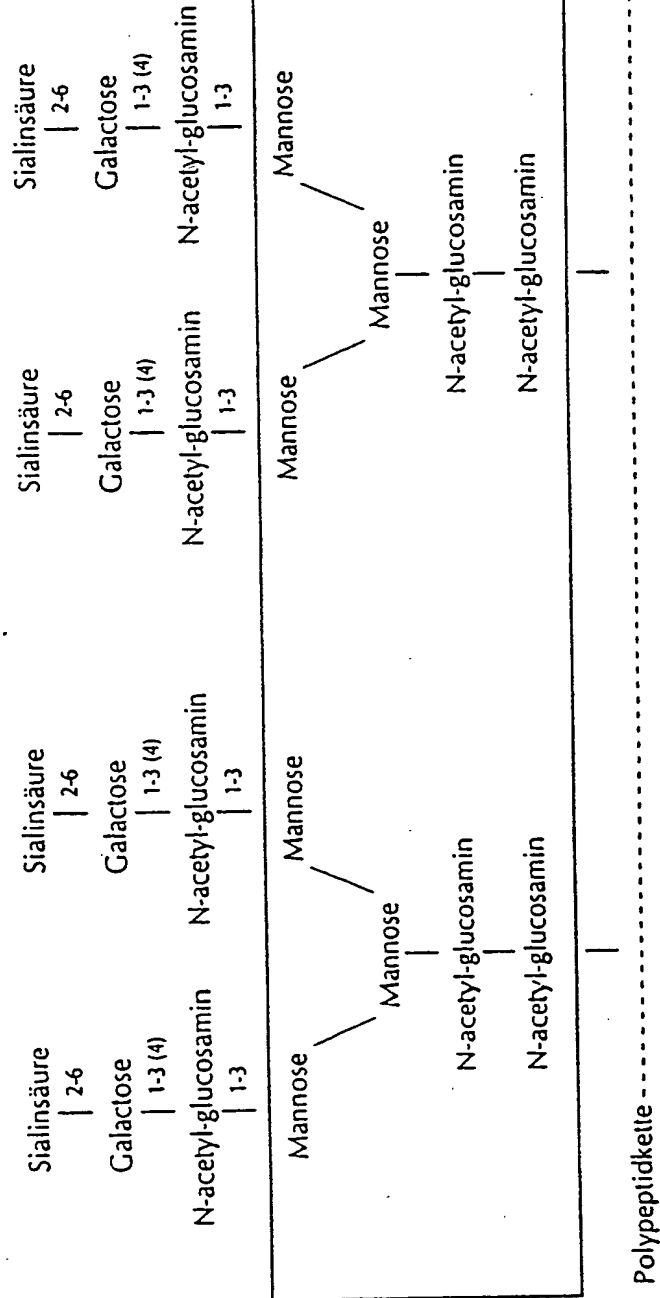
- (a) festphasenseitigen anti-Transferrin-Antikörper,
- (b) markiertes oder mit einer Markierung bindefähiges Sambucus nigra-Lectin und ggf. übliche Hilfs-, Puffer- und Zusatzstoffe.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen



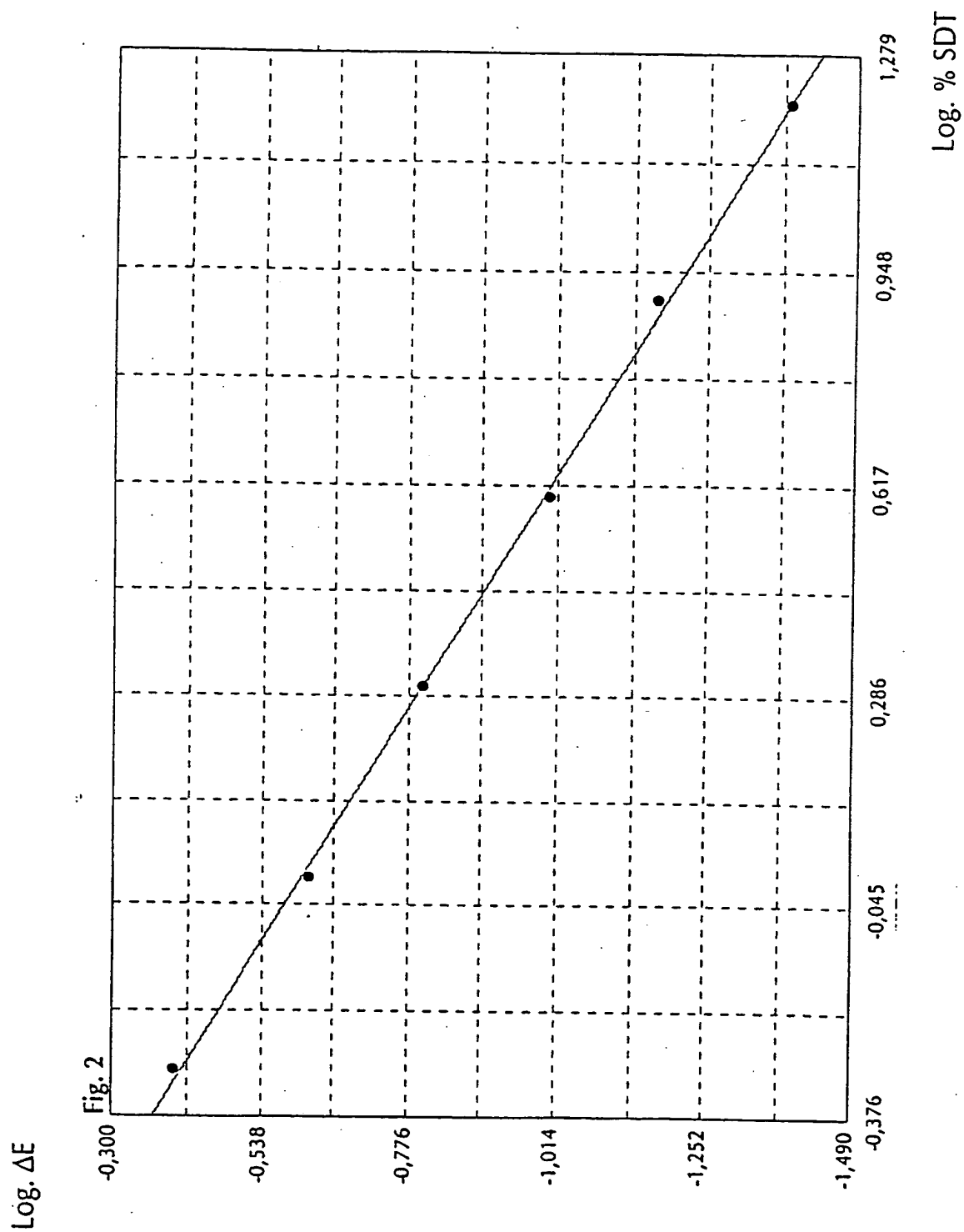
FIGUR 1

Tetrasialotransferrin



FIGUR 2a

Logarithmische Standardkurve



FIGUR 2b

Sigmoide Standardkurve

